

파벽(破壁) 영지포자가 고지방식이 섭취 마우스의 지방축적 및 체중감량에 미치는 영향

박금주* · 강정일 · 김태석 · 이상윤 · 여익현
(주)풀무원 식문화연구원

Effect of Cell-Wall Broken Spores of *Ganoderma lucidum*(Leys. ex.Fr.) Karst on the Lipid Accumulation and Body Weight Reduction in C57BL/6J Mice fed High-Fat Diet

Kum-Ju Pak*, Jung Il Kang, Tae-Seok Kim, Sang-Yun Lee, and Ik-Hyun Yeo
The Food and Culture Institute, Pulmuone Co., Ltd. Seoul, 120-749, Korea

Abstract – This study was performed to investigate the effects of cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* on the lipid accumulation and body weight reduction in C57BL/6J mice. Six-week-old C57BL/6J mice were randomly divided into 5 groups and assigned to one of these groups; normal chow diet(Nor) group, high-fat diet(HFD) group, HFD plus spores of *Ganoderma lucidum* 800 mg/kg/day (HFD + GS/B) group, HFD plus cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* 400 mg/kg/day (HFD + BGS/A) group and finally HFD plus cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* 800mg/kg/day (HFD + BGS/B). The experimental groups which were treated oral co-administration with cell-wall broken(or original) spores of *Ganoderma lucidum* and HFD significantly attenuated accumulative body weight gain, compared with HFD group. Administration of these experimental materials also resulted in significant reduction not only the serum levels of total cholesterol, homocysteine but also the lipid accumulation in liver tissue. But in the almost of results the cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* were evaluated superior than the original one. These results indicate that cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* may inhibit the lipid accumulation in blood as well as liver tissue. Therefore it may be a valuable candidate for the therapy preventing obese induced hyperlipidemic symptoms.

Key words – Cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum*, High-fat diet, Lipid accumulation, Homocysteine, Weight gain reduction

2012년 국민건강영양조사에 따르면 국내 성인 비만 인구는 남성의 경우 3명 가운데 1명, 여성의 경우 4명 가운데 1명으로 집계되며 특히 체질량 지수가 30 이상인 고도비만 인구가 지속 증가하여 남성 성인의 경우 4.8%, 여성 성인의 경우 5.0%를 나타내었다. 비만은 많은 연구를 통하여 밝혀진 대로 제2형 당뇨병,¹⁾ 심혈관 질환,²⁾ 특정 암의 발생 증가,³⁾ 폐쇄성 수면 무호흡증과 같은 호흡기 합병증,⁴⁾ 관절염⁵⁾과 연관되어져 있음으로 비만에 의한 이와 같은 질병 위험의 증가는 수명을 단축시킬 수 있고 또한 삶의 질을 떨어뜨릴수 있어 국내에서도 그 심각성이 더욱 증가되고 있다. 실제로 현재 40세 성인은 비만으로 인해 그 수명이 약 7년 정도 단축된다고 보고되기도 하여⁶⁾ 비만에 대한 경각심을

높이고 있다. 이러한 비만의 심각성은 곧바로 의료비용의 지출을 증가로 이어지고 있는데 2008년 세계보건기구(WHO)의 보고에 따르면 유럽의 경우 전체 의료비용에서 비만은 2-8%의 비율을 차지하고 있다고 한다. 국내의 경우에도 2005년 보건복지부가 제시한 '비만의 사회경제적 비용 산출'에 관한 보고에서 한국인 비만의 사회경제적 비용은 직접비용 1조 771억원, 간접비용 7,125억 원 등 총 1조 7,923억 원으로 분석한바 있다.

그러나 현재까지 비만치료를 위하여 제공 되어지고 있는 방법들의 경우, 비만 치료 효과가 부족하거나 심각한 수준의 부작용을 수반하는 등의 문제를 내포하고 있다. 특히 특정 약물요법의 경우 해당 부작용으로 인해 사용이 금지되어 지기도 하였는데 이러한 예로 최근에 대표적인 식욕억제제로 처방되어져 왔던 약물인 시부트라민(Sibutramine; 상

*교신저자(E-mail): kjparka@pulmuone.co.kr
(Tel): +82-2-3277-8558

표명 **Reductil**이 혈압 상승에 대한 심각한 부작용으로 인해 시장 철회가 미 FDA에 의해 결정되었지만 있다. 따라서 이와 같은 배경으로 인해 부작용이 적으면서도 비만 치료 효과가 우수한 천연물질에 대한 관심이 날로 증가하고 있다.

영지버섯은 담자균류 민주름목에 속하며 활엽수 뿌리에 서 발생하여 땅위로 돋는 1년생 버섯으로 예로부터 불로초(不老草)라고 불리며 약재로 많이 처방되어져 왔다. 다수의 연구를 통해 영지버섯 추출물에 대한 항종양활성,⁷⁾ 면역증대활성,⁸⁾ 항산화작용에 대한 효과⁹⁾가 밝혀져 있고 특히 베타글루칸을 10 mg/g 이상으로 함유하도록 제조 표준화된 영지버섯 추출물의 경우 국내 건강기능식품공전에 혈행개선에 대한 고시형원료로 등재되어져 있음으로 건강기능식품으로의 개발이 가능하다.¹⁰⁾

반면 영지 포자는 6-7 μm × 10-12 μm 크기의 갈색 타원 형태로, 숙성한 영지에서 배출된다. 이들 포자는 영지버섯의 유전정보와 생리활성 물질을 매우 밀도 있게 함유하고 있음으로 앞서 언급한 영지버섯 자실체보다 더욱 우수한 천연연소재로서 적용이 기대되어져 왔다. 그러나 최근에 이르러서야 영지포자 분말에 대한 대량 확보기술이 개발되어져 영지포자 분말에 대한 연구가 본격적으로 가능하게 되었다. 이에 최근의 연구들을 통해 확인된 영지포자의 대표적인 생리활성을 살펴보면, Guo, L. 등이 보고한 영지포자 다당체의 면역증진효과¹¹⁾와 Fukuzama, M. 등이 보고한 영지포자 장쇄지방산의 항암활성¹²⁾등이 있는데 이는 앞서 기술한 영지버섯 자실체가 나타내는 생리활성들과 그 맥락을 같이 하고 있다.

한편 영지버섯 포자는 매우 단단한 두껍의 세포벽으로 이루어져 있음으로 이는 영지포자로부터 유효성분의 체내로의 흡수에 방해가 될 수 있겠다. 실제로 세포벽을 파벽한 영지포자의 경우 세포벽이 파괴되지 않은 영지포자에 비해 면역역력등의 생리활성이 강화된다는 보고가 있어 이러한 사실을 뒷받침 하고 있기도 하다.¹³⁾ 그러나 세포벽을 파벽한 영지포자에 있어 비만과 비만 유래 지방간증 및 고지혈증 등에 대한 개선효과는 보고된 적이 없다.

이에 본 연구에서는 세포벽을 파벽한 영지포자의 비만과 비만 유래 지방간증 및 고지혈증 등에 대한 개선효과를 평가하고자 하였고 이를 위하여 고지방 및 고콜레스테롤 식이를 통해 비만을 유도한 마우스 동물모델을 이용하였다.

재료 및 방법

영지포자의 파벽(破壁) - 본 실험에 사용된 영지포자는 중국 충칭(重慶)시 생물기술연구소에서 공급받은 것으로 渝農赤 영지 1번 균종으로부터 배양된 영지버섯 자실체에서 2013년에 수확한 것을 충칭시 생물기술연구소의 뤼진화(羅金華) 소장이 감별한것이다. 영지포자는 6-7 μm × 10-12 μm 의 크

기로 매우 미세함으로 이와 같은 영지포자의 세포벽 파벽을 위해 본 실험에서는 습식분쇄를 통한 미세(나노)분쇄를 진행하였다. 통상적으로 습식분쇄는 비즈(beads)라고 불리는 매디아를 투입하여 미세분쇄가 이루어지도록 하는 beads mill을 의미함으로 본 실험에서도 이를 적용하였다(Netzsch, Labstar, Germany). 또한 분쇄 공정 중 발생할 수 있는 미세분쇄물간의 응집현상을 예방하고자 2% Gum arabic(Sigma, USA)을 혼합하였다. 마지막으로 습식분쇄 후 전자현미경 통해 영지포자에 대한 파벽 여부를 확인함으로 영지포자에 대한 파벽을 완료할 수 있었다.

실험동물 사육 - 본 실험에 사용된 실험동물은 C57BL/6J 계 6주령의 수컷마우스로 SLC Inc.(Shizuoka, Japan)으로부터 구입하여 사용하였다. 실험동물은 (주)풀무원 식문화연구원 동물사육실에서 온도 22±2°C, 상대습도 50±10%, 12시간 명암주기의 조건하에서 사육되었으며 일주일간의 적응기간을 거친 후 체중 측정 및 건강상태에 대한 육안 관찰을 통해 적합한 마우스만을 선별하여 실험에 사용하였다. 이때 실험에 사용된 실험동물의 평균무게는 21.71±0.16 g이었다. 한편 비만 및 비만유래 간지방증 및 고지혈증 유발을 위하여 실험동물에 식이한 사료는 Harlan사(Madison, USA)의 고지방식이 사료(TD.06414)에 1% 콜레스테롤을 별도로 추가하여 조제한 것으로서 두벌바이오텍(Seoul, Korea)으로부터 구매하여 사용하였고 Harlan사의 TD. 06414 사료는 열량 중 60%가 지방으로부터 제공되도록 조제한 고지방 식이이다. 이후 준비된 실험동물은 무작위로 6마리씩 5개 그룹으로 나누었고 이들 각각의 그룹을 정상식이 대조군(Nor), 고지방식이 대조군(HFD), 고지방식이 + 영지포자 800 mg/kg/day 투여군(HFD-GS/B), 고지방식이 + 파벽 영지포자 400 mg/kg/day 투여군(HFD-BGS/A), 고지방식이 + 파벽 영지포자 800 mg/kg/day 투여군(HFD-BGS/B)으로 하여 실험 기간 중 물과 사료를 자유식이 하도록 하였으며 이때 정상식이 대조군은 일반 고형사료를 제공하였다. 지방식을 식이하는 실험군의 경우 매일 1회 동일한 시간에 각각의 시험물질과 현탁용액을 9주간 경구 투여 하였는데 고지방식이 대조군의 경우 시험물질의 현탁용액인 0.5% CMC (Carboxymethylcellulose) 용액만을 동일한 방법으로 경구 투여하여 시험물질 투여군과 비교 조사하였다. 본 연구의 동물실험은 (주)풀무원 실험동물윤리 위원회의 승인 하에 윤리규정을 준수하며 실시하였으므로 본 실험 수행기간 중 실험동물에 대한 가혹 행위 및 스트레스 요인이 발생하지 않았고 식이 종료 후 실험동물 희생시에는 이산화탄소를 이용하여 안락사하였다(동물실험 승인번호: PMO20140403-B).

체중 및 식이섭취량 측정 - 실험동물의 체중은 1주일 간격으로 오전 10시에 0.1 g 단위까지 측정하였고 각 시험군에 대한 최종 체중 증가량은 식이 종료 직후 체중에서 시험개시 전 체중을 감하여 산출하였다. 실험동물의 식이섭취량

은 1주에 2회 측정하였다.

혈액 및 조직적출 - 혈액은 실험동물을 식이 종료일에 에테르로 흡입마취 시키고 개복하여 심장으로 부터 채혈하였으며 1,900×g에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 이를 혈중 총콜레스테롤 및 호모시스테인 함량 측정을 위한 시료로 사용하였다. 또한 실험동물 개복 후 간 조직을 적출하였으며 적출한 간 조직은 생리식염수로 세척하고 여분의 수분을 제거한 뒤 중량을 측정하였으며, 간 조직의 일부는 따로 분리하여 간 조직 염색을 통한 현미경 관찰을 위해 포르말린용액으로 고정시켰고, 나머지는 조직 내 지질 분석을 위한 시료 사용하고자 액체질소로 급속 동결시켜 -70°C의 deep freezer에서 보관하였다.

혈중 및 간 조직 내의 지질함량 측정 - 혈중 총콜레스테롤 함량은 혈액분석기(Dri-Chem 4000i, Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용하여 정해진 프로토콜에 따라 측정하여 산출하였다. 한편 간 조직중의 중성지질 및 측정을 위하여 먼저 간 조직 중의 지질을 추출하였는데 이는 Folch 등의 방법¹⁴⁾에 준하였다. 즉 간 조직을 chloroform: methanol(2:1, v/v) 혼합액에 넣어 균질화하고 원심분리하여 chloroform 층을 획득한 뒤 1% triton X 100을 다시 넣고 건조하였다. 이후 이를 증류수에 녹여 간 조직 내 중성지방의 함량을 혈액분석기를 통하여 동일한 방법으로 측정하였다.

혈중 호모시스테인 함량 측정 - 효소법에 의하여 homocysteine kit(Axis-Shield Diagnostics Ltd, USA)를 이용하여 자동분석기(Hitachi 7180, Hitachi, Japan)로 측정하였다.

간 조직의 현미경 관찰 - 실험동물 희생직후 적출하여 10% 포르말린 용액에 고정시킨 간 조직의 일부를 생리식염수로 세척하고 파라핀 블록을 제작한 후 절편기를 이용하여 5 µm 두께로 절단하였다. 이와 같이 제조된 조직절편은 xylene으로 파라핀을 제거시키고 hematoxylin & eosin (Sigma, USA)시약으로 핵과 세포질을 염색하여 광학현미경(Axio, Zeiss, Jena, Germany)으로 각 시험군들의 조직을 형태학적으로 관찰하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 SPSS 통계 package(Version 14.0)을 이용하여 평균치와 표준편차를 산출하였고 Duncan's

multiple range test를 이용하여 각 시험군의 평균치간의 유의성을 검정 하였다($p < 0.05$).

결과 및 고찰

체중에 대한 효과 - 고지방식을 통해 비만을 유도한 실험동물에서 과벽 영지포자가 체중 증가에 미치는 영향을 조사하고자 과벽 영지포자를 각각 400 mg/kg과 800 mg/kg씩 실험동물들에 9주간 경구투여하고 그 변화를 확인하였다(Table I). 고지방 식이 투여 전 실험동물의 평균 체중은 21.71 ± 0.16 g이었으며 각 군별 유의차는 확인되지 않았다. 그러나 이들 실험동물들에게 9주간 일반식이 및 고지방 식이를 식이한 후 최종 체중증가량을 확인하였을 때 정상식을 제공하는 대조군(Nor)에서는 체중 증가량이 20.28%인 반면 고지방식을 제공하는 대조군(HFD)의 경우 57.9%를 나타내어 고지방식이군에서 2배 이상 체중이 증가되었음을 확인 할 수 있었다($p < 0.01$). 한편 비만 유도 시 발생하는 체중 증가와 간지방증 및 고지혈증에 대한 과벽 영지포자의 효능 비교를 위해 비교군으로 설정한 고지방식이 + 영지포자 투여군(HFD-GS/B)에서는 43.78%, 고지방식이 + 과벽 영지포자 400 mg/kg/day 투여군(HFD-BGS/A)에서는 43.82% 고지방식이 + 과벽 영지포자 800 mg/kg/day 투여군(HFD-BGS/B)에서는 40.62%의 체중증가율이 각각 확인 되었고 이러한 실험군의 체중증가율은 고지방 식이 대조군(HFD)의 대하여 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$). 따라서 이러한 결과는 영지포자가 고지방식을 통해 유도되는 비만에 대하여 체중 감소 효과가 있고 실험군들간의 비교에서는 영지포자에 대한 과벽 진행시 이러한 효과가 높아지는 경향을 나타냄을 확인할 수 있도록 하였다. 본 실험 기간 중 각 실험군들의 식이 섭취량은 매주 2회 측정하였는데 이들 고지방 식이 섭취군들에서는 식이 섭취량에 대한 유의적인 차이가 확인되지 않았다.

혈중 총콜레스테롤과 호모시스테인에서의 효과 - 체중 증가에 따른 체내 VLDL 및 지방조직 증가는 혈중 총 콜레스테롤 함량을 상승시킨다고 하며¹⁵⁾ 이러한 비만과 혈중 총콜레스테롤 증가에 대한 상관성은 이미 임상 시험을 통해 검

Table I. Effect of cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* on reducing body weight in high-fat fed mice²⁾

	Groups ¹⁾				
	Nor	HFD	HFD-GS/B	HFD-BGS/A	HFD-BGS/B
Initial (g)	21.48±0.26 ^a	22.50±0.16 ^a	21.47±0.25 ^a	21.44±0.50 ^a	21.71±0.43 ^a
Final (g)	25.83±0.87 ^a	36.84±0.67 ^b	31.39±0.65 ^c	31.92±1.34 ^c	31.12±0.75 ^c
Weight gain (g)	4.42±0.67 ^a	13.75±0.43 ^b	9.71±0.37 ^c	9.45±0.82 ^c	9.22±0.38 ^c

¹⁾Nor, normal diet group; HFD, high-fat diet group; HFD-GS/B, high-fat diet + 800 mg/kg/day *Ganoderma lucidum* spores; HFD-BGS/A, high-fat diet + 400 mg/kg/day cell wall broken spores of *Ganoderma lucidum*; HFD-BGS/B, high-fat diet + 800 mg/kg/day high cell wall broken spores of *Ganoderma lucidum*

²⁾Values are mean±SE (n=6). Values with different letters in a column are significantly different at $p < 0.05$

증된 바 있다.¹⁶⁻¹⁸⁾ 또한 동맥경화증을 비롯한 심혈관 질환에 대하여 독립위험인자로 알려진 호모시스테인은¹⁹⁾ 비만 상태에서 그 혈중 함량이 높아²⁰⁾ 비만에 의한 심혈관 질환 발생의 원인이 되기도 한다.

이에 본 연구에서도 파벽 영지포자 식이가 고지방식이 유도 비만에서의 혈중 콜레스테롤과 호모시스테인 함량에 미치는 영향을 조사하고자 하였으며 이를 위하여 각 실험군의 혈청을 분리하고 분석하였다(Table II). 실험결과, 앞서 여러 논문에서 보고된 대로²¹⁻²³⁾ 본 실험에서도 고지방 식이를 섭취한 대조군(HFD)의 혈중 총 콜레스테롤 함량은 정상 식이를 섭취한 대조군(Nor)에 대하여 유의적으로 그 함량이 증가하였고 식이 종료 후 혈중 총 콜레스테롤의 함량은 정상 대조군(Nor)의 경우 123.5±4.16 mg/dL을 고지방식이 대조군(HFD)의 경우 185.6±9.82 mg/dL을 나타내었다. 한편 영지포자 및 파벽 영지포자를 투여한 실험군의 경우 고지방 식이를 통한 이러한 총콜레스테롤의 증가가 뚜렷이 감소하였을 뿐 아니라 고지방식이에 의한 총콜레스테롤의 증가가 정상 대조군(Nor)과 대비하여서도 유의적인 수준에서 발생되지 않았다. 이들 실험군들의 식이 9주후 혈중 총콜레스테롤 함량을 자세히 기술하면 고지방식이 + 영지포자 투여군(HFD-GS/B)은 125.67±12.57 mg/dL, 고지방식이 + 파벽 영지포자 400 mg/day/kg 투여군(HFD-BGS/A)은 129.7±5.28 mg/dL 고지방식이 + 파벽 영지포자 800 mg/kg/day 투여군(HFD-BGS/B)는 118.2±4.01 mg/dL과 같고 이는 정상 대조군(Nor)의 총콜레스테롤 함량과 유사한 수준임을 확인할 수 있다. 한편 혈중 호모시스테인 함량은 고지방식이에 의하여 그 함량이 증가하여 정상식이 대조군(Nor)이 7.69±1.32 µM/L의 함량을 나타낸 반면 고지방식이 대조군(HFD)는 9.66±0.21 µM/L의 함량을 나타내었다. 이에 대하여 영

지포자 및 파벽 영지포자를 투여한 실험군들의 혈중 호모시스테인의 함량은 고지방식이 대조군(HFD) 대비 유의적으로 낮은 수준으로 확인되었다(Table II). 특히 파벽 영지포자 투여군의 경우 영지포자 투여군 대비 낮은 수준에서 농도의존적으로 혈중 호모시스테인 함량에 대한 감소 경향을 나타내었고 고지방식이 + 파벽 영지포자 800 mg/kg/day 투여군(HFD-BGS/H)군의 경우 혈중 호모시스테인의 함량이 6.02±0.34 µM/L으로 본 실험군들 중 가장 낮은 수준이었다.

이와 같이 파벽 영지포자는 고지방 식이를 통하여 유도된 비만에서의 고콜레스테롤혈증과 고호모시스테인혈증에 대하여 매우 뛰어난 강하효과를 나타내었는데 앞서 기술한 대로 고콜레스테롤혈증과 고호모시스테인혈증은 심혈관 질환 발병의 주요 원인이 됨으로 위의 결과로부터 파벽 영지포자가 비만유래 심혈관 질환 발병의 예방에 매우 효과적일 수 있음을 알 수 있겠다.

간 무게 및 간 조직의 형태학적 변화에 대한 개선 효과 – 비만식이 섭취 시 간 조직의 지방축적이 발생하게 됨으로 비만동물에서는 간 크기와 무게가 증가하게 된다. 따라서 본 실험에서도 파벽 영지포자가 이러한 비만 유래 간지방증에 미치는 영향을 확인하고자 하였으며 이를 위하여 각 실험군에서의 간 무게를 측정하였으며 또한 간 조직으로부터 파란편 절편을 제작한 후, hematoxylin & eosin 시액으로 조직염색 하여 각 실험군의 간 조직에서의 형태학적 변화에 대한 양상을 관찰하였다. 먼저 비만식이 섭취를 통한 간 무게의 변화는 Table III에 나타내었는데 비만식이 섭취 대조군(HFD)의 경우 간 무게가 정상식이 섭취군(Nor)에 비하여 약 1.35배 증가하였으므로 이를 통해 비만식이에 의한 간지방증이 유발되었음을 짐작케 하였다. 반면 영지포자와 파벽 영지포자를 제공한 실험군에서의 간 무게는 비만식이

Table II. Effect of cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* on serum total cholesterol and homocysteine in high-fat fed mice²⁾

	Groups ¹⁾				
	Nor	HFD	HFD-GS/B	HFD-BGS/A	HFD-BGS/B
Total cholesterol (mg/dL)	123.50±4.16 ^a	185.63±9.82 ^b	125.67±12.57 ^a	129.67±5.28 ^a	118.17±4.01 ^a
Homocysteine (µmol/L)	7.69±1.32 ^{ab}	9.66±0.21 ^a	6.82±0.40 ^b	6.13±0.24 ^b	6.02±0.34 ^b

¹⁾Groups are the same as in Table I.

²⁾Values are mean±SE (n=6). Values with different letters in a column are significantly different at *p*<0.05

Table III. Effect of cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* on liver weight and lipid contents in high-fat fed mice²⁾

	Groups ¹⁾				
	Nor	HFD	HFD-GS/B	HFD-BGS/A	HFD-BGS/B
Liver weight (g)	1.20±0.36 ^a	1.57±0.38 ^b	1.26±0.48 ^a	1.32±0.87 ^a	1.26±0.50 ^a
Triglyceride (mg/g)	214.42±27.55 ^a	395.98±38.05 ^b	308.20±68.86 ^{ab}	324.11±50.01 ^{ab}	250.89±30.51 ^a
Total cholesterol (mg/g)	9.33±1.31 ^a	33.75±4.11 ^b	31.25±5.86 ^b	29.75±3.49 ^b	25.08±3.00 ^b

¹⁾Groups are the same as in Table I.

²⁾Values are mean±SE (n=6). Values with different letters in a column are significantly different at *p*<0.05

대조군 대비 유의적으로 낮은 수준으로 확인되었는데 지방식이 + 영지포자 800 mg/kg/day 섭취군(HFD + GS/B)은 고지방식이 대조군(HFD) 대비 77.8% 수준의 간 무게를, 고지방식이 + 파벽 영지포자 실험군에서의 간 무게는 고지방식이 대조군(HFD) 대비 각각 81.9%와 77.8% 수준이었다. 이후 각 실험군들의 간 조직에 대한 hematoxylin & eosin 염색을 통해 간 조직의 형태를 관찰한 결과, 앞서 간 무게 변화에 대한 결과 확인을 통하여 짐작한 바와 같이 정상식이군에서는 전체적으로 진한 선홍색을 나타내면서 간 세포가 치밀하게 나열되어 있는 반면 고지방식이 대조군의 간 조직은 전체적으로 옅은 분홍색을 나타내며 전형적인 지방증소견을 보여주었다. 즉 간 조직에서 대공포 지방증과 혼합 대공포 및 소공포 지방증이 관찰되었고 일부 세포에서는 세포질 내 체액 침착이 확인되기도 하였다(Fig. 1A). 따라서 이러한 간지방증이 고지방식이 대조군에서의 간 무게 증가의 원인이 됨을 확인할 수 있었다. 반면 영지포자 및 파벽 영지포자 섭취군 간 조직에 대한 형태학적 관찰을 진행한 결과, 이들 실험군들의 간 조직 내에서는 지방축적 수준이 현저히 낮았고 전반적으로 균일한 선홍색을 유지하고 있는 등 정상식이군과 유사한 형태학적 모습을 보여 주었다. 이로써 영지포자가 고지방식이로 인한 간 조직의 지방축적을 저해시키는 효과가 있음을 형태학적으로 우선 확인 할 수 있었다.

간 조직 내 지질 함량에 대한 효과 - 앞서 간 조직에 대한 hematoxylin & eosin 염색을 통하여 확인한 바 있는 영지포자 및 파벽 영지포자에 대한 지방간증 개선효과를 정량적으로 확인하고자 간 조직중의 중성지질 및 총 콜레스테롤 함량을 분석하였고 해당 결과를 Table III에 나타내었다. Table III에서 보는바와 같이 고지방식이 대조군(HFD)

간 조직에서의 중성지질 및 총콜레스테롤 함량은 정상식이군(Nor) 간 조직에서의 중성지질 및 총콜레스테롤 함량 대비 각각 1.84배와 3.31배 증가하여 간 조직 염색을 통하여 확인하였던 고지방식이 대조군(HFD)에서의 지방간증을 다시 확인 할 수 있었다. 반면 실험물질을 투여한 실험군들의 경우, 지방조직 내 중성지방 및 총콜레스테롤 함량이 고지방식이 대조군 대비 낮은 함량을 나타내었고 특히 고지방식이 + 파벽 영지포자 800 mg/kg/day 섭취군의 경우 중성지방 증가률이 정상식이군 대비 17%에 그쳐 고지방식이 대조군과 현격한 차이를 나타내었으며, 뿐만 아니라 이는 고지방식이 + 영지포자 800 mg/kg/day 섭취군에 대하여서도 81.4% 수준으로 낮아 영지포자에 대한 파벽 진행시 이에 대한 효과가 증가됨을 알 수 있게 하였다.

한편 본 실험에서 확인된 이와 같은 파벽 영지포자의 체중 감소 및 지질 개선 효과는 영지포자에 함유된 β -glucan 및 oleic acid, 세포벽 내 chitin 성분에 의한 것으로 예측된다. 즉 식용버섯에서의 지질 개선 효과를 보고한 선행 논문들을 살펴보면 영지버섯 자실체 내 β -glucan은 본태성 고혈압 흰쥐에서 혈중 콜레스테롤에 대한 강하효과를 나타내었고²⁴⁾ 고콜레스테롤 식이에 풀버섯 액체배양액 β -glucan을 1% 첨가하고 이를 섭취시킨 sprague-dawley 흰쥐에서 풀버섯의 β -glucan은 혈중 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도를 감소시켰는데, 이는 담즙산의 변화없이 대변 중 중성스테롤의 양을 증가시킨것으로서 식용버섯 β -glucan의 이와 같은 콜레스테롤 강하효과가 간에서의 HMG-CoA reductase와 관련 있음을 제시하기도 하였다.²⁵⁾ 특히 영지포자 내 다당체의 경우 파벽 시 영지포자로부터의 유출이 용이하게 됨으로²⁶⁾ 본 연구에서 확인된 영지포자 대비 파벽 영지포자에서의 관련 효능 강화가 이러한 다당체의 실험동물 내 이용

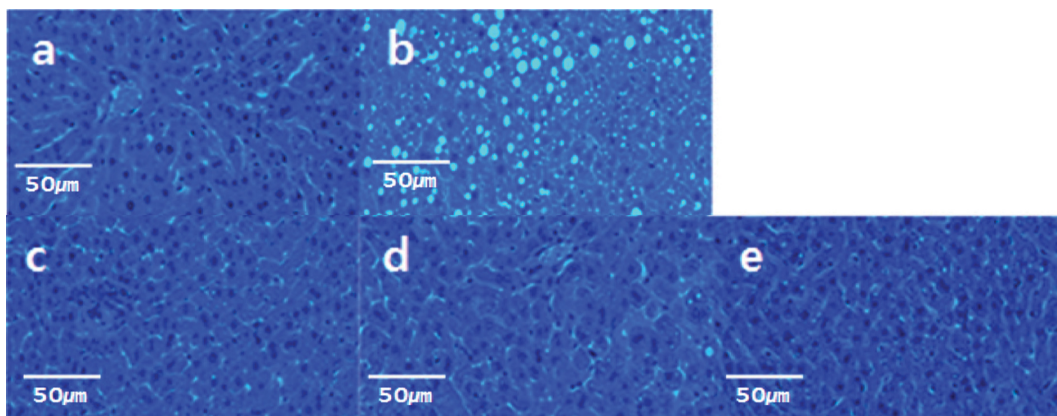


Fig. 1. Effect of cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* on lipid accumulation in liver tissues of high-fat diet fed mice by histological assess (200 \times). Each group's liver tissue was stained with hematoxylin-eosin reagent. a) normal diet group, b) high-fat diet (HFD) group, c) HFD + *Ganoderma lucidum* spore 800 mg/kg/day (HFD-GS/B) group, d) HFD + cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* 400 mg/kg/day (HFD-BGS/A), e) HFD + cell-wall broken spores of *Ganoderma lucidum* 800 mg/kg/day (HFD-BGS/B) group.

을 증가에 의한 것으로도 판단할 수 있겠으며 실제로 파벽 전후 영지포자에 대한 β -glucan의 함량을 측정하였을 때 그 함량은 각각 1.37%와 2.36%로 파벽으로 인해 영지포자내 β -glucan의 용출이 용이하여졌음을 확인할 수 있었다. 또한 Uchiyama, H. 등은 β -glucan의 섭취가 실험동물의 장내 균총변화를 유도하여 유익균을 증가시킬 수 있고²⁷⁾ 유산균을 비롯한 비피도균과 같은 유익균의 증가는 지질개선 효과 및 체중감소 효과를 또한 나타낼 수 있음으로²⁸⁾ 본 실험에서 확인된 영지포자의 지질개선 및 체중감소 효과가 영지포자 유래 β -glucan에 의한 실험동물 장내 균총변화에 기인하였을 가능성에 대해서도 고려해 볼 수 있겠으나 이에 대한 보다 세부적인 실험이 향후 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Oleic acid는 단일 불포화지방산이며 이러한 단일 불포화지방산의 섭취는 체내 LDL 콜레스테롤의 입자 크기를 증가시켜 수용체와의 친화력을 향상시킨다고 하며 또한 LDL 콜레스테롤에 대한 산화 억제 및 혈관 부착을 억제하는 것을 통하여 체내 혈행개선 효과를 나타내는 것으로 알려져 있는데³⁰⁻³⁴⁾ 이와 관련하여서는 올리브유의 혈행개선 효과가 올리브유내 oleic acid에 기인한 것으로 보고되어져 있다.³⁴⁾ 영지포자의 경우 이러한 oleic acid의 함량이 영지포자 내 전체 지방산 중에서 가장 높는데 본 실험에서 사용한 영지포자에 대한 지방산 함량을 분석해 보았을 때 그 함량은 25.27%였고 이중 oleic acid는 15.73%로 전체 지방성분에서 62.8%였다. 따라서 본 실험 수행 시 확인된 파벽 영지포자에서의 관련 효능 강화는 앞서 β -glucan과 더불어 oleic acid 또한 파벽을 통해 체내 흡수가 향상되었기 때문일 것으로 사료 할 수 있겠다.

Chitin은 주로 갑각류의 껍질이나 버섯류와 같은 균류의 세포벽을 이루는 구성성분으로 *N*-acetyl-D-glucosamine이 β ,1-4 결합을 이루고 있는 식이섬유의 한 형태이다. 식이 섬유가 체내 지질 대사에 미치는 개선 효과에 대해서는 이제껏 많은 보고가 있었고³⁵⁾ 식이 섬유가 가지는 보수력, cation exchange capacity 및 쓸개즙과 콜레스테롤등과의 결합특성 등이 이에 대한 기작인 것으로 밝혀져 있다.^{36,37)} Chitin 또한 다른 식이섬유 형태들과 마찬가지로 보수력 및 쓸개즙을 흡수하는 성질을 가지고 있고³⁸⁾ 최근의 연구결과를 통해서도 혈중 중성지방 개선 효과 또한 확인된바 있어³⁹⁾ 영지포자 세포벽의 주요성분인 chitin이 본 연구를 통하여 확인한 고지방식이 유래 혈중 및 간 조직 내 고지혈증에 대한 개선효과에도 영향을 나타내었을 것으로 판단할 수 있겠다. Chen, T. 등의 보고에 따르면 영지포자 세포벽내 chitin의 함량은 52.08-57.88%의 범위를 나타내었다.⁴⁰⁾

마지막으로 본 연구에서 확인된 파벽 영지포자의 고호모시스테인혈증에 대한 개선 효과와 관련하여서는 혈중 호모시스테인의 함량은 엽산과 비타민 B₉ 및 해당 대사와정에 관여하는 효소 활성화와 밀접한 관련을 가지고 있는 것으로

알려져 있다.^{41,42)} 그러나 본 연구에 사용된 파벽 영지포자는 엽산 및 비타민 B₁₂, 비타민 B₆를 함유하고 있지 않은 것으로 확인되었으므로 파벽 영지포자의 호모시스테인에 대한 효과는 실험중 이들 영양성분의 보충에 의한 효과는 아니라 사료된다. 따라서 이에 대한 보다 정확한 기작을 확인하기 위해서는 호모시스테인 대사 과정 중 특정 관여 효소에 영지포자가 미치는 영향에 대한 추가적인 연구를 진행하여야 할 것으로 판단된다.

결론

본 연구는 고지방식을 통해 비만이 유도된 실험동물모델에서 나타나는 고지혈증 및 간 지방 축적에 대한 파벽 영지포자의 개선 효과에 관한 것으로 이를 규명하기 위하여 실험동물을 정상식을 제공한 정상대조군(Nor), 고지방식이 대조군(HFD), 고지방식이 + 영지포자 800 mg/kg/day 섭취 대조군(HFD-GS/B), 고지방식이 + 파벽 영지포자 400 mg/kg/day 섭취군(HFD-BGS/A) 및 고지방식이 + 파벽 영지포자 800 mg/kg/day 섭취군(HFD-BGS/B)으로 5개의 실험군을 나누어 9주간 사육하고 혈중 및 간 조직에서 지질 함량 등을 분석, 비교하였다. 실험결과 고지방식을 식이한 대조군에 대하여 영지포자 및 파벽 영지포자를 투여한 실험군들은 체중, 혈중 총콜레스테롤 및 호모시스테인 함량이 유의적으로 감소되었고 특히 세포벽 파괴를 통하여 영지포자 내 생리활성 물질의 체내 유입을 향상시킨²⁶⁾ 파벽 영지포자를 투여한 실험군들에서는 각 측정 지표들에 대하여 농도의존적인 경향을 나타내었고 또한 파벽 영지포자 800 mg/kg/day 섭취군의 경우 동일함량의 실험물질을 투여한 고지방식이 + 영지포자 800 mg/kg/day 섭취 대조군에 비하여 나은 수준으로 분석되어 파벽으로 인한 이들 개선효과가 강화되었음을 보여주었다. 또한 고지방식에 의해 유도된 간 조직에서의 지질 축적형태와 지질 함량을 비교한 결과에서도 실험물질 투여군의 경우 간세포 사이에 작은 지방구들이 부분적으로만 분포되어 있는 형태를 나타내어 파벽 영지포자가 간 지방축적에 대하여 개선효과가 있음을 확인할 수 있었고 간 조직 내 지질 함량 역시 동일한 경향을 나타내어 간 조직 내 중성지방 함량이 고지방식이 대조군 대비 파벽 영지포자 400 mg/kg/day 섭취군에서는 18.2%, 파벽 영지포자 800 mg/kg/day 섭취군에서는 36.7%의 유의적인 감소를 나타내었다. 따라서 이와 같은 파벽 영지포자의 간 조직 내 지방축적 저해효과로 인해 고지방식이 대조군과 실험군간의 간 무게 함량에도 유의적인 감소를 확인 할 수 있었다.

이에 본 연구 결과를 종합하면 파벽 영지포자는 고지혈증 및 간 조직 지질 축적에 대한 개선 효과가 있는 것으로 판단할 수 있겠고 이를 통하여 파벽 영지포자가 심각한 지질

축적으로 인해 대사성 질환의 유발 가능성을 높이는 고지혈증과 지방간증 환자 및 현재까지 효과적인 치료제가 없는 비알콜성 지방간 환자에게도 치료 또는 치료보조제로서 가치 있는 후보물질이 될 수 있을 것으로 기대할 수 있었다.

사 사

본 연구를 위하여 영지포자 실험물질을 제공하여 주신 중국 충칭시(重慶市) 생물기술연구소에 감사드립니다.

인용문헌

- Knights, A. J., Funnell, A. P., Pearson, R. C., Crossley, M. and Bell-Anderson, K. S. (2014) Adipokines and insulin action : A sensitive issue. *Adipocyte* **3**: 88-96.
- Paneni, F., Coatantino, S. and Cosentino, F. (2014) Insulin resistance, diabetes, and cardiovascular risk. *Curr. Atheroscler. Rep.* **16**: 419-426.
- Berger, N. A. (2014) Obesity and cancer pathogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1311**: 57-76.
- Degache, F., Sforza, E., Dauphinot, V., Celle, S., Garcin, A., Collet, P., Pichot, V., Barthelemy, J. C., Roche, F. and Proof Study Group. (2013) Relation of central fat mass to obstructive sleep apnea in the elderly. *Sleep* **36**: 501-7.
- Lementowski, P. W. and Zelicof, S. B. (2008) Obesity and osteoarthritis. *Am. J. Orthop.* **37**: 148-51.
- Peeters, A., Barendregt, J. J., Willekens, F., Mackenbach, J. P., Al, M. A., Bonneux, L. and the Netherlands Epidemiology and Demography Compression of Morbidity Research Group (NECOM). (2003) Obesity in adulthood and its consequences for life expectancy: a life-table analysis. *Ann. Intern. Med.* **138**: 24-32.
- Kim, S. W. (1998) Studies on anti-microbial and anti-cancer functions of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **27**: 1183-1188.
- Kim, S. W. and Kim, E. S. (1997) Studies on the immunomodulation effects of polysaccharide extracted from *Ganoderma lucidum* on macrophage. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 148-153.
- Oh, S. I. and Lee, M. S. (2005) Antioxidative and antimutagenic effects of *Ganoderma lucidum* Krast Extracts. *Korean J. Food & Nutr.* **18**: 54-62.
- 건강기능식품의 기준 및 규격 (2013) 식품의약품안전처.
- Gao, P., Hirano, T., Chen, Z., Yasuhara, T., Nakata, Y. and Sugimoto, A. (2012) Isolation and identification of C-19 fatty acids with anti-tumor activity from the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi mushroom). *Fitoterapia* **83**: 490-499.
- Fukuzawa, M., Yamaguchi, R., Hide, I., Chen, Z., Hirai, Y., Sugimoto, A., Yasuhara, T. and Nakata, Y. (2008) Possible involvement of long chain fatty acids in the spores of *Ganoderma lucidum* (reishi houshi) to its anti-tumor activity. *Biol. Pharm. Bull.* **31**: 1933-1937.
- Wang, P. Y., Wang, S. Z., Lin, S. Q. and Lin, Z. B. (2005) Comparison of the immunomodulatory effects of spore polysaccharides and broken spore polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum* on murine splenic lymphocytes and peritoneal macrophages *in vitro*. *Beijing Da Xue Xue Bao* **18**: 569-74.
- Friedewal, W., Levy, R. and Fredrickson, D. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**: 499-502.
- Gorden, T., Fisher, M. and Ernst, N. (1982) Relation of diet to LDL cholesterol, VLDL cholesterol and plasma total cholesterol and triglycerides in white adults. *Atherosclerosis* **2**: 502-512.
- Kannel, W. B. and Gordon, T. (1979) Physiologic and medical concomitants of obesity. The Framingham study in obesity in America. 125-163, NIH Publication, Washing D.C.
- Park, Y. H., Rhee, C. S. and Lee, Y. C. (1993) Distribution patterns of serum lipids by age and the relation of serum lipids to degree of obesity and blood pressure in korean adults. *Korean Journal of Lipidology and Atherosclerosis* **3**: 165-180.
- Jin, B. K. and Kim, J. Y. (1995) Association between serum total cholesterol, blood pressure, obesity and life style in a population. *J. Korean Public Health Assoc.* **21**: 3-18.
- Graham, I. M., Daly, L. E., Refsum, Fh. M., Robinson, K., Brattström, L. E., Ueland, P. M., Palma-Reis, R. J., Boers, G. H., Sheahan, R. G., Israelsson, B., Uiterwaal, C. S., Meleady, R., McMaster, D., Verhoef, P., Witteman, J., Rubba, P., Bellet, H., Wautrecht, J. C., de Valk, H. W. *et al.* (1997) Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The european concerted action project. *JAMA* **177**: 1775-81.
- Fonseca, V., Guba, S. C. and Fink, L. M. (1999) Hyperhomocysteinemia and the endocrine system: implications for atherosclerosis and thrombosis. *Endocr. Rev.* **20**: 738-59.
- Lee, S. H., Lim, S. W., Lee, Y. M., Seo, J. W. and Kim, D. K. (2011) Inhibitory effects of *Triticum aestivum* L. extracts on liver lipid accumulation in high fat-fed mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **42**: 309-326.
- Ryu, H. J., Um, M. Y., Ahn, J. Y., Jung, C. H., Huh, D., Kim T. W. and Ha, T. Y. (2011) Anti-obesity effect of *Hypsizigus marmoreus* in high fat-fed mice. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**: 1708-1714.
- Park, S. J., Jeon, Y. J., Kim, H. J. and Han, J. S. (2013) Anti-obesity effects of *Ishige okamurae* extract in C57BL/6J mice fed high-fat diet. *Korean J. Food Sci. Technol.* **45**: 199-205.
- Kabir, Y., Kimura, S. and Tamura, T. (1988) Dietary effects of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypotensive rats (SHR). *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **34**: 433-438.
- Cheung, P. C. K. (1996) The hypocholesterolemic effect of

- extracellular polysaccharide from the submerged fermentation of mushroom. *Nutr. Res.* **16**: 1953-1957.
26. Bao, X. F. and Fang, J. N. (2001) Studies on difference between sporoderm-broken and nonbroken spores of *Ganoderma lucidum* (Leyss, ex Fr.) Karst. by polysaccharide analysis. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* **26**: 326-328.
 27. Uchiyama, H., Iwai, A., Asada, Y., Muramatsu, D., Aoki, S., Kawata, K., Kusano, K., Nagashima, K., Yasokawa, D., Okabe, M. and Miyazaki, T. (2012) A small scale study on the effects of oral administratin of the β -glucan produced by *Aureobasidium pullulans* on milk quality and cytokine expressions of Holstein cows, and on bacterial flora in the intestines of Japanese black calves. *BioMed Central Res. Notes* **19**: 189-196.
 28. Xiao, J. Z., Kondo, S., Takahashi, N., Miyaji, K., Oshida, K., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., Kokubo, S. and Hosono, A. (2003) Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J. Dairy Sci.* **87**: 2452-2461.
 29. Chait, A., Brazg, R. I., Tribble, D. L. and Krauss, R. M. (1993) Susceptibility of small, dense, low-density lipoproteins to oxidative modification in subjects with the atherogenic lipoprotein phenotype, pattern B. *Am. J. Med.* **94**: 350-356.
 30. Libby, P. (2002) Atherosclerosis: The new view. *Sci. Am.* **286**: 46-55.
 31. Rudel, L. L., Parks, J. S. and Sawyer, J. K. (1995) Compared with dietary monounsaturated and saturated fat, polyunsaturated fat protects african green monkeys from coronary artery atherosclerosis. *Arterioscl. Thromb. Vas.* **15**: 2101-2110.
 32. Nigon, F., Lesnik, P., Rouis, M. and Chapman, M. J. (1991) Discrete subspecies of human low density lipoproteins are heterogeneous in their interaction with the cellular LDL receptor. *J. Lipid Res.* **32**: 1741-1753.
 33. Galeano, N. F., Milne, R., Marcel, Y. L., Walsh, M. T., Levy, E., Ngu'yen, T. D., Gleeson, A., Arad, Y., Witte, L., Al Haideri, M., Rumsey, S. C. and Deckelbaum, R. J. (1994) Apoprotein B structure and receptor recognition of triglyceride-rich low density lipoprotein (LDL) is modified in small LDL but not in tirglyceride-rich LDL of normal size. *J. Biol. Chem.* **269**: 511-519.
 34. Ramirez-Torotosa, M. C., Urbano, G., Lopez-Jurado, M., Nestares, T., Gomez, M. C., Mir, A., Ros, E., Mataix, J. and Gil A. (1999) Extra-virgin olive oil increases the resistance of LDL to oxidation more than refined olive oil in free-living men with peripheral vascular disease. *J. Nutr.* **129**: 2177-2183.
 35. Kang, H. J. and Song, Y. S. (1997) Dietary fiber and cholesterol metabolism. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**: 358-369.
 36. Schneeman, B. O. (1987) Dietary fiber and gastrointestinal function. *Nutrition Reviews* **45**: 129-132.
 37. Davidson, M. H. and MacDonald, A. (1998) Fiber: Forms and functions. *Nutrition Research* **18**: 617-624.
 38. Chang, H. J., Jeon, D. W. and Lee, S. R. (1994) *In vitro* study on the functionality in digestive tract of chitin and chitosan from crab shell. *Korean J. Food Sci. Technol.* **26**: 348-354.
 39. Park, J. R., Moon, I. S., Choi, S. H. and Shon, M. Y. (1999) Effects of chitin and chitosan on lipid metabolism in rats. *J. Korean Soc. Food* **28**: 477-483.
 40. Chen, T. Q., Li, K. B., Xu, J., Zhu, P. G. and Zhen, Y. (1997) Study on Log-Cultivated *Ganoderma lucidum* Spores ()—General Properties and Chemical Components. *Acta Edulis Fungi* **4**: 24-28.
 41. Ueland, P. M. and Refsum, H. (1989) Plasma homocysteine, a risk fator for vascular disease: Plasma levels in health, disease and drug therapy. *J. Lab. Clin. Med.* **114**: 473-501.
 42. Stabler, S. P., Marcell, P. D., Podell, E. R., Allen, R. H., Savage, D. G. and Linderbaum, J. (1988) Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cabalamin or folate deficiency detected by capillray gas chromatography-mass spectrometry. *J. Clin. Invest.* **81**: 466-474.
- (2014. 9. 19 접수; 2014. 10. 16 심사; 2014. 11. 12 게재확정)